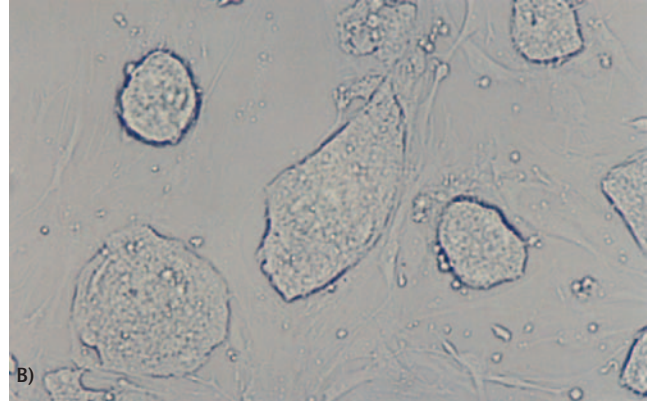
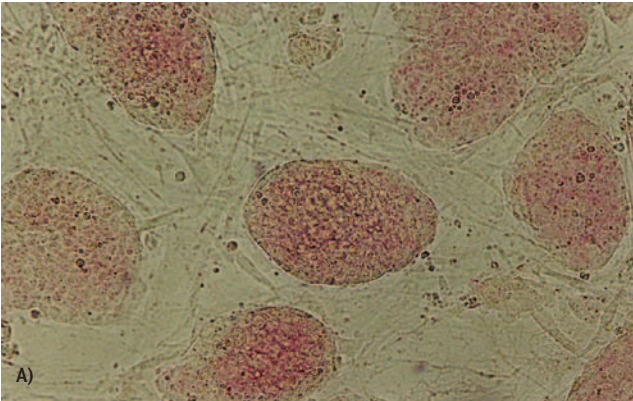


# TÜRKİYE'DE KÖK HÜCRE ÇALIŞMALARI

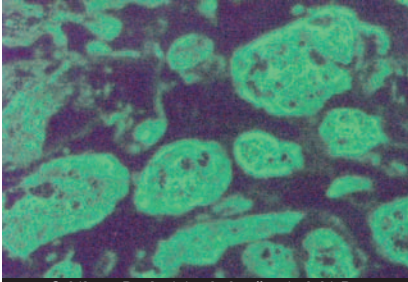


TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve  
Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü'nde Arzu  
Taş, kök hücrelerin tutulduğu beslenme  
kaplarını kontrol ediyor.

Bir insanın yaşama attığı ilk adımları kapsayan embriyo evresinde ortaya çıkan “kök hücreler”, son yıllarda genetik biliminin ve tıbbın gözdesi haline geldi. Nedeni, bunların bedenimizde bulunan her türlü hücreye dönüşebilme potansiyelini içlerinde taşımaları. Bu özellikleri, onları kalp, karaciğer bozuklukları, Alzheimer, Parkinson gibi beyin dokusunun hasar görmesinden kaynaklanan hastalıkların ve şimdye kadar çare bulunamamış pek çok hastalığın tedavisi için başlıca umut haline getirmiş bulunuyor. Kök hücrelerle ilgili çalışmaları şimdye kadar yabancı bilim dergilerinde, gazete ve televizyon haberlerinde görmeye alıştık. Bu alandaki ilerlemeleri insanlığın ortak zaferi olarak değerlendirdik; heyecan duyduk. Tabii bu alkış, biraz da içimizde duyduğumuz bir burukluğu örtmeye yönelikti. “Neden biz de yapamıyoruz?”, “Hep başkalarını mı alkışlayacağız?”. Ama bakıyoruz ki, kendi biliminsanlarımız da kendi laboratuvarlarımızda bu alanda önemli çalışmalar gerçekleştirmeye başlamışlar. Bu önemli çalışmalardan biri de geçtiğimiz günlerde TÜBİTAK Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü'nde, değerli hocalarımız gözetiminde genç bir araştırmacımızca gerçekleştirildi...

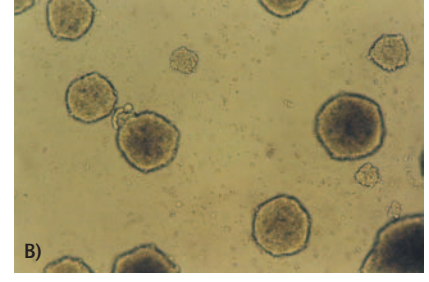
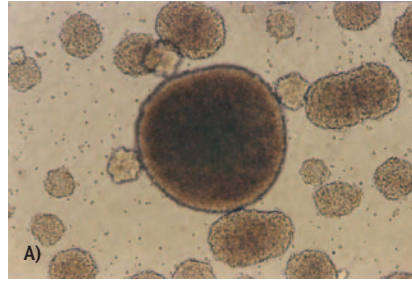


Şekil 1. Besleyici tabaka üzerindeki R1 kolonileri (20X).A) ALP fosfataz aktivitesi (+) B) MEF üzerindeki boyanmamış koloniler.



Şekil .2. Besleyici tabaka üzerindeki R1 kolonilerinin SSEA-1 immunboyaması (20X)

TÜBİTAK- Gen Mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü Transgen ve Deney Hayvanları Laboratuvarında fare embriyonik kök hücrelerin farklılaşması üzerine bir çalışma yapıldı. Bu çalışmada embriyonik kök hücrelerin nöronal (sinir hücreleri) hücrelere



Şekil 3. Süspanse kültür EB'ler. A) 2. gün EB'ler (10X) B) 3.gün EB'ler (10X).

farklılaşması sağlandı.

Laboratuvarında, embriyonik kök hücreler, besleyici hücre tabakası olarak adlandırılan, fare embriyonik fibroblast hücreleri üzerinde ve lösemi baskılayıcı faktör (Leukemia Inhibitory Factor; LIF) varlığında kültüre edildiler. Besle-

yici hücre tabakası ve/veya LIF varlığında, embriyonik kök hücreler farklılaşmadan uzun süre içinde tutulabilirler. Embriyonik kök hücre incelendiğinde; büyük bir çekirdeğe sahip olduğu görülür. Yuvarlak ve düzgün bir morfolojileri vardır. Kolonileri oluşturan hücrelerin sınırları ayırt edilemez fakat hücrelerin çekirdekleri kolaylıkla görülebilir. Koloniler faz-kontrast mikroskopla incelendiğinde koloni sınırları parlak görülür.

Embriyonik Kökhücrelerin (EK) farklılaşmadan kültür içinde tutulduklarını göstermek için alkalın fosfataz etkinliğine ve SSEA-1 (Stage Specific Embryo-

## Kök Hücre

Tarih boyunca insanoğlu hastalıklara çare bulmaya ve insan ömrünü uzatmaya çalışmış. Bu çalışmalar günümüzde de devam etmekte. Özellikle hücre-doku-organ nakillerinde karşılaşılan zorluklar sonucunda; bireyin kendisinden alınan hücrelerin (kök hücreler) kullanımı gündeme geldi. Kök hücrelerin farklılaşma potansiyellerinin keşfi, doku hasarlarının iyileştirilmesinde bu hücrelerin kullanılabilmesini düşündürmüş bulunuyor. Böylece, sinir sisteminde dejenerasyon ile ortaya çıkan Parkinson, Alzheimer, Huntington hastalığı, omurilik yaralanmaları, inme ve multiple skleroz gibi pek çok hastalığın tedavisi farklılaştırılmış özgün sinir hücrelerinin nakli ile mümkün olabilecektir. Yine aynı teknolojiyle çok çeşitli hastalıklar kök hücrelerin onarıcı veya yerine geçici özelliğiyle tedavi edilebilecek. Örneğin, kalp krizi sonrası hasar gören kalp kası onarılabilecek, osteoporozda kemik erimesinin önüne geçilebilecek, şeker hastalarına insülin üreten kök hücreler çare olabilecektir.

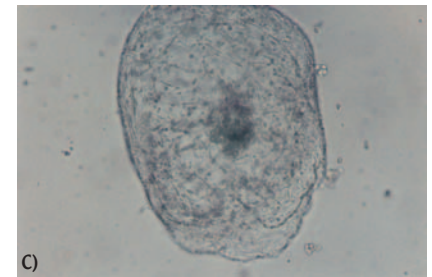
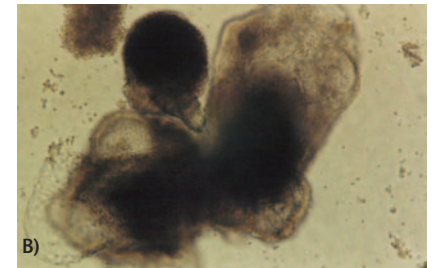
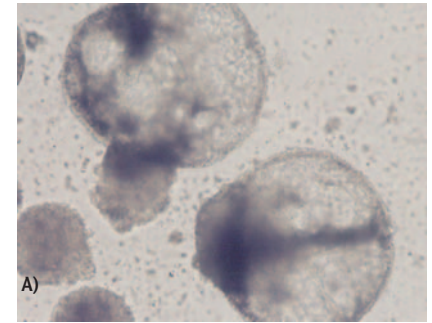
Embriyonik kök hücreler; vücuttaki değişik hücre tiplerine dönüşebilme ve sınırsız bölünme yetenekleriyle son yılların popüler araştırma konularından biri haline geldi. Embriyonik kök hücre (EK) hatlarının kurulması, memelilerin gelişimsel biyolojilerini araştıran bir çok çalışmaya olanak sağladı. Son yirmi yıl içerisinde laboratuvar ortamında embriyonik kök hücrelerden farklı tipte somatik (vücut) hücreler elde edildi. Elde edilen somatik hücreler, hematopoietik hücreler (kan hücreleri), endotel hücresi, kalp kası hücresi, çizgili kas hücresi, düz kas hücresi, yağ hücresi, osteoblast (kemik hücreleri), kondrosit (kıkırdak hücreleri), nöronlar (sinir hücreleri). Embriyonik kök hücrelerden homojen ve saf bir hücre popülasyonu elde etmek için çalışmalar halen devam ediyor.

Kök hücrelerin farklılaşma potansiyelleri incelendiğinde, farklı özellikteki kök hücrelerle karşılaşıyor. Hiyerarşinin en üst sırasında totipotent (her türlü hücreye dönüşebilen) hücreler yer alıyor. Totipotent hücreler, embriyoya ve embriyoya ait dokuları oluşturabilirler. Totipotent hücrelerin bir alt basamağında pluripotent (belli bir grup hücreye

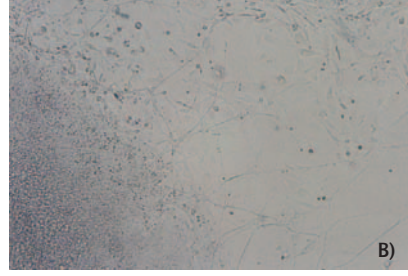
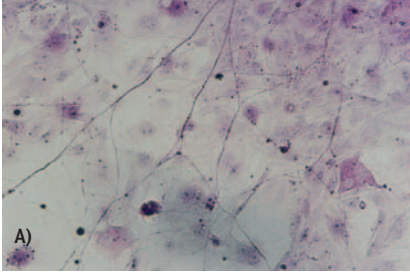
dönüşebilen) hücreler yer alırlar. Pluripotent hücreler (embriyonik kök hücreler), embriyoya ait üç tohum yaprağından gelişen tüm hücreleri oluşturabilirler fakat embriyo dışı yapıları oluşturamadıkları için bir embriyoya şekillendiremezler. Pluripotent hücreler, blastosistin iç hücre kitlesinden elde edilirler. Gelişim ilerledikçe hücreler pluripotent özelliklerini kaybederek daha özelleşmiş hücrelere dönüşürler. Yalnızca buldukları dokuya özgü hücreleri oluşturabilen kök hücreler, multipotent kök hücreler diye adlandırılır. Son dönemde multipotent kök hücrelerle yapılan çalışmalarda, sadece buldukları dokuya ait hücreleri değil farklı dokulara ait hücreleri de meydana getirebildikleri gösterildi. Bu tip farklılaşma, transfarklılaşma veya plastisite olarak adlandırılır. Hiyerarşinin en altındaysa unipotent (tek yetilli) kök hücreler ya da öncül (progenitor) hücreler bulunur. Progenitor hücreler, sadece belli hücre hatlarına farklılaşma eğilimi gösterirler. Örneğin, eritroblastlar (kırmızı kan hücrelerinin öncülleri) sadece eritrositleri (kırmızı kan hücresi) oluşturabilirler. Farklı tipte bir hücreyi meydana getiremezler.

EK hücreler in vitro şartlarda, besleyici hücre tabakası ve sitokinlerin varlığında farklılaşmadan yaşamlarını sürdürebilirler. Besleyici tabaka olarak fare embriyonik fibroblast hücreleri kullanılmaktadır. Lösemi baskılayıcı faktör adlı sitokin, fare EK hücrelerinin farklılaşmasını önlemekte.

Besleyici tabakalar ve lösemi baskılayıcı faktör, kültür ortamından uzaklaştırıldığında EK hücreler kendiliklerinden farklılaşırlar. EK hücreleri kültür ortamlarında üç boyutlu hücre topları oluştururlar ve bu üç boyutlu yapı embrioid (embriyo benzeri) cisim olarak adlandırılır. Embrioid cisimler incelendiğinde, farklılaşmış ve farklılaşmamış hücre gruplarından oluşan bu yapının, dış yüzeyindeki endodermal hücreler ve içindeki boşlukla 6 günlük bir embriyoya benzediği görülmüş bulunuyor. EB'ler üç tohum yaprağına ait hücrelerin tümünü içerir. Embriyonik kök hücrelerin kültür ortamına uygun uyarılar verildiğinde, farklı hücre tiplerine farklılaşırlar. Bu uyarılardan birisi retinoik asit. Retinoik asit kültür ortamına verildiğinde embriyonik kök hücrelerin sinir hücrelerine farklılaşmasını sağlar.



Şekil 4. Süspanse kültür EB'ler. A) 8. gün blastosist görünümündeki EB'ler (10X) B) 10.gün atım gösteren EB (10X) C) 27 günlük EB (10X)



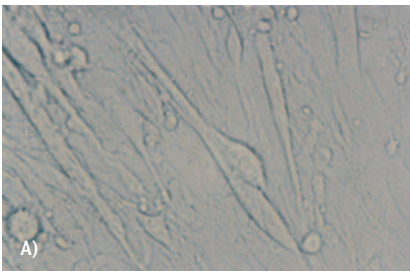
Şekil 5. Kontrolsüz farklılaşma. A) 17.gün H-E boyası Nöron benzeri hücreler ve sinir ağları (20X). B)8.gün Nöron benzeri hücreler sinir ağları oluşturmuş (20X)

nic Antigen-1) antikoruna ile boyanması- na bakıldı. Yapılan çalışma sonucunda EK hücrelerin her iki boyamayla da pozitif tepki verdiği görüldü.

Embriyonik kök hücrelerin kültür ortamından besleyici hücre tabakası ve/veya LIF'in uzaklaştırılması ve bakteriyolojik petri kapları kullanılarak "embryo benzeri yapılar" (EB) oluşturulabilir. EB'ler kültür petri kaplarına ekildiklerinde yayılmaya ve ileri dönemde de farklılaşmaya başlarlar.

Yapılan çalışmada hücrelerin petri yüzeyine yapışmalarını engelleyen kültürde, EK hücrelerin üç boyutlu hücre kümeleri (EB) oluşturmaları sağlandı. Bu kümeler incelendiğinde, kültürün ilk yedi günü sıkı düzenlenmiş (kompakt), düzgün ve yuvarlak yapılarını korudukları gözlemlendi. Sekizinci günden itibaren, bu özelliklerini kaybetmeye başladıkları saptandı. Kültürün onuncu gününde; EB'lerin iç kısımlarında kalp atımına benzer şekilde atımlar gözlemlendi. Bu atımlar kültürün devam eden günlerinde de izlendi. İlerleyen dönemlerde bu EB'lerin topaklanmış yapılarını tamamen kaybettiği; şeffaf ve şişmiş bir balonu andıran yapılar oluşturdukları gözlemlendi.

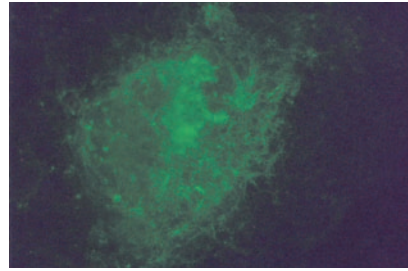
Dört günlük EB'ler kültür petri- lerine ekildi ve LIF ve belli bir uyarıcı içer- meyen besiyerisiyle kültürleri yapıldı.



Şekil 6. Kontrolsüz farklılaşma, atım gösteren hücreler A) 17.gün kalp kası hücreleri (10X). B) 30.gün kalp kası hücreleri (10X)

EB'lerin kültür kaplarına ekiminden sonra; atım yapan kümeler ilk kez kültürün 7. gününde ortaya çıktı. Kültürün 17 gününde kalp kas hücrelerine benzer hücrelerin oluştuğu ve hücrelerin tek olarak atımlarına devam ettikleri görüldü. Bunun yanı sıra, sinir hücrelerine benzer hücreler ve bu hücreler arasında ağ yapıları gözlemlendi. Sinir hücrelerinin öncülleri nestin antikoruna ile gösterildi ve ancak kültürün 9. gününde pozitif reaksiyon gösterdi. Fakat oluşan sinir hücrelerinin oranı düşüktü.

Bir sonraki aşamada, oluşturulan EB'lere nöronal farklılaşmayı başlatan retiniok asit uygulandı. Dört günlük EB'lere dört gün daha retiniok asit uygulandı ve ardından ekimleri yapıldı. Sinir öncül hücreleri; nestin, sinir hücreleri; NCAM (Neural Cell Adhesion Molecule, Sinir Hücre Yapışma Molekülü),

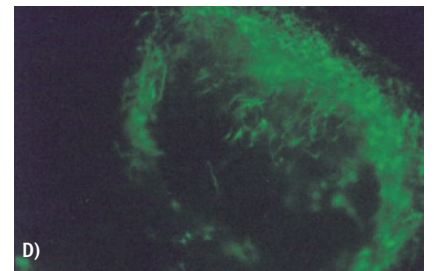
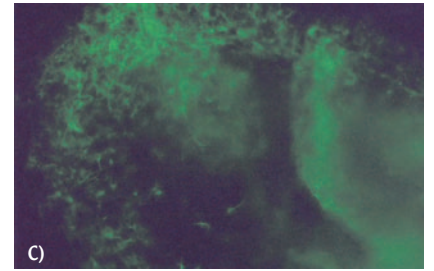
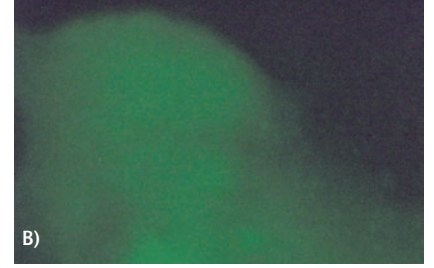
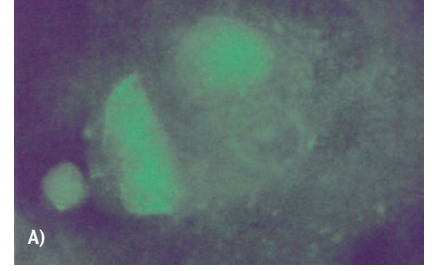


Şekil 7. Kontrolsüz farklılaşma 9.gün Nestin (+) EB (10X).

kas hücreleri; Actin ve glial hücreler; GFAP (Glial Fibriller Asidic Protein) ile tespit edildi.

Ekim sonrasında ikinci gün, ilk sinir öncül hücreleri nestin antikoruna ile pozitif reaksiyon verdi. Kültürün ilerleyen günlerinde nestinin pozitifliği azalırken diğer antikorların pozitifliğinde artış gözlemlendi. Sinir hücreleri 5. günde oluşmaya başladılar ve 7. günde bu hücrelerin oranı arttı. Dokuzuncu günde glial hücrelerin oluştuğu görüldü. Kültürde kas hücrelerinin oluşup oluşmadığını anlamak için Actin antikoruna ile immun boyama yapıldı ve bu antikorla boyanma olmadığı görüldü. Sonuç olarak, retiniok asit uygulaması sonucunda kültürde kas hücrelerinin oluşmadığı gözlemlendi.

EK hücrelerin izolasyonunun ve değişik hücre tiplerine farklılaşma kapasite-



Şekil 8. 4-/4+ RA uygulaması. A) 2.gün boyama Nestin (+) EB. B) 7.gün NCAM (+) EB C) 7.gün GFAP (+) EB D) 9.gün GFAP (+)

telerinin belirlenmesinin hastalıkların tedavilerinde yeni ufuklar açabileceği düşünülüyor. Özellikle sinir sisteminde meydana gelen hasarların tedavisinin güçlüğü, EK hücreleri sinir hücrelerine farklılaşmaya yönelte çalışmalarını ön plana çıkarıyor. Üzerinde en çok çalışılan konu, tek tip hücreye dönüştürülmüş homojen bir hücre popülasyonunun oluşturulması için uygun kültür ortamının belirlenmesi. Fare EK hücreleriyle yaptığımız farklılaşma çalışması, bu yolda atılan adımlardan birini oluşturuyor. Hedefimiz sinir hücresine farklılaşan hücre oranını artırmak. Bu yolda çalışmalarımız devam ediyor.

Arzu Taş  
Doç.Dr.Sezen Arat  
Tubitak- GMBAE Transgen Laboratuvarı